

REC'D 15 APR 2003

WIPO PCT

PCT/KR 103/500593 #2
20/KR 25.03.2003
Rec'd PCT/PTO 24 SEP 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

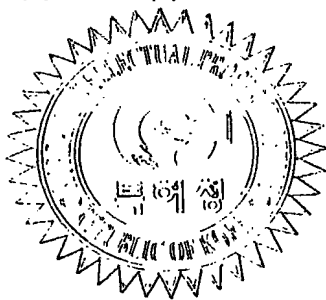
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0049766
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 08월 22일
Date of Application AUG 22, 2002

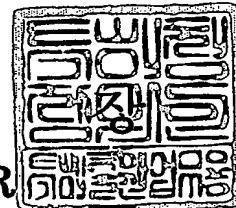
출원인 : 주식회사 바이오시너젠
Applicant(s) BioSynergen, Inc.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 03 월 25 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.08.22
【발명의 명칭】	라이소포스파티딜콜린 또는 그 유사체를 포함하는 선천성 면역 증강 조성물
【발명의 영문명칭】	COMPOSITION FOR IMPROVING INNATE IMMUNITY COMPRISING LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE AND ITS DERIVATIVES
【출원인】	
【명칭】	주식회사 바이오시너젠
【출원인코드】	1-2000-030433-5
【대리인】	
【성명】	김윤배
【대리인코드】	9-1998-000024-4
【포괄위임등록번호】	2002-018468-8
【대리인】	
【성명】	이범일
【대리인코드】	9-1998-000310-6
【포괄위임등록번호】	2002-018469-5
【대리인】	
【성명】	이세진
【대리인코드】	9-1998-000312-9
【포괄위임등록번호】	2002-018470-8
【대리인】	
【성명】	조영신
【대리인코드】	9-1999-000332-8
【포괄위임등록번호】	2002-018471-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영희
【성명의 영문표기】	KIM, Yung Hi
【주민등록번호】	361004-2670414
【우편번호】	200-959

【주소】	강원도 춘천시 후평1동 845번지 현대1차아파트 103동 404호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	송동근		
【성명의 영문표기】	SONG, Dong Keun		
【주민등록번호】	561029-1670415		
【우편번호】	200-163		
【주소】	강원도 춘천시 후평3동 동아아파트 101동 403호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	서홍원		
【성명의 영문표기】	SUH, Hong Won		
【주민등록번호】	570304-1067011		
【우편번호】	200-963		
【주소】	강원도 춘천시 후평3동 동아아파트 101동 205호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	허성오		
【성명의 영문표기】	HUH, Sung Oh		
【주민등록번호】	610801-1030615		
【우편번호】	200-180		
【주소】	강원도 춘천시 석사동 석사대우아파트 108동 101호		
【국적】	KR		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 배 (인) 대리인 이범일 (인) 대리인 이세진 (인) 대리인 조영신 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	16	면	29,000 원
【가산출원료】	0	면	0 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	0	항	0 원

020049766

출력 일자: 2003/4/3

【합계】	29,000 원
【감면사유】	소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】	8,700 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.소기업임을 증명하는 서류_1 통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 선천성 면역의 증강 효과가 우수한 약학 조성물에 관한 것으로, 유효성
분으로서 라이소포스파티딜콜린 및 그 유도체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

선천성 면역, 감염성 질환, 라이소포스파티딜콜린

【명세서】**【발명의 명칭】**

라이소포스파티딜콜린 또는 그 유사체를 포함하는 선천성 면역 증강 조성물
{COMPOSITION FOR IMPROVING INNATE IMMUNITY COMPRISING LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE AND ITS
DERIVATIVES}

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 대장균의 복강내 투여에 의한 복막염 유발 ICR 마우스들 (실험군 및 대조군)의 생존율을 나타내는 그래프이다.

도 1b는 대장균의 복강내 투여에 의한 복막염 유발 ICR 마우스들 (실험군 및 대조군)의 복강내 대장균 수를 나타내는 그래프이다.

도 2은 CLP 모델의 ICR 마우스들 (실험군 및 대조군)의 복강내 대장균 수를 나타내는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<4> 본 발명은 라이소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 및 그 유도체를 포함하는 선천성 면역(innate immunity) 증강용 조성물에 관한 것이다.

<5> 면역이란 동물체내에 존재하는 자기방어 체계로서, 외부로부터 침입해오는 각종 물질이나 생명체를 자기자신과 구별해내어 이 침입자를 제거하는 생물학적 현상이다. 이

러한 자기방어를 위한 감시체계는 선천성 면역과 순응성 면역(adaptive immunity)으로 대별할 수 있다.

- <6> 순응성 면역은 B 세포나 T 세포에 의한 면역반응으로 일단 체내로 침입한 항원에 대하여 반응을 하되, 반드시 같은 종류의 항원이 계속 존재하거나 반복 침입해왔을 경우에 작용하는 면역체계이다. 따라서, 이러한 면역반응은 특정 항원에 대한 특이한 반응이다.
- <7> 선천성 면역은 체내에는 어떤 항원에 대해 노출되어진 경험이 없는 경우라도 직접적으로 반응하여 공격세포를 파괴하는 비특이적(non-specific) 면역반응으로, 단핵세포/대식세포(monocytes/macrophages) 및 중성구(neutrophils)와 같은 식세포(phagocyte) 등이 관여하여 공격대상 세포의 종류에 별로 구애됨이 없이 다양한 기능을 발휘하는 것이 특징이며, 진화적으로 보다 오래된 자기방어 체계로서 감염에 대한 방어에 있어서 제 1 전선으로서 역할을 한다.
- <8> 면역증강제란 숙주의 특이 또는 비특이, 세포성 및 체액성 면역반응을 상승시키는 모든 물질을 말하는데, 최근에 감염이나 종양의 치료에 면역강화가 이용되면서 많은 관심을 불러일으키고 있다. 부작용이 없으면서 유용한 면역증강 효과를 나타내는 물질의 개발은 대단히 중요한 의미를 가져, 그 개발이 요구되고 있는 실정이다. 이에 본 발명자들은 우수한 면역기능 증강작용을 나타내며 부작용이 거의 없는 안전한 의약성분을 찾아내기 위해 집중적인 연구를 수행하였으며, 그 결과 라이소포스파티딜콜린 및 그 유도체가 선천성 면역증강 작용을 하여 감염성 질환의 치료 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

- <9> 라이소포스파티딜콜린은 시험관내의 단핵세포에서 IL-1 β 의 생산을 증가시키고 (Liu-Wu, Y., Hurt-Camejo, E. & Wiklund, O. Lysophosphatidylcholine induces the production of IL-1 β by human monocytes. Atherosclerosis 137, 351-7. (1998)), 또한 시험관내의 중성구에서 슈퍼옥사이드 음이온 발생을 증가시킨다 (Savage, J.E., Theron, A.J. & Anderson, R. Activation of neutrophil membrane-associated oxidative metabolism by ultraviolet radiation. J Invest Dermatol 101, 532-6. (1993))는 보고가 있는 정도이다. 그러나, 라이소포스파티딜콜린이 실제로 체내에서 세균성 감염질환들이 발병되었을 때, 선천성 면역증강 작용을 하여 그 질환들을 치료할 수 있다는 것에 대하여는 이제까지 어떠한 문헌에서도 알려진 바가 없다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

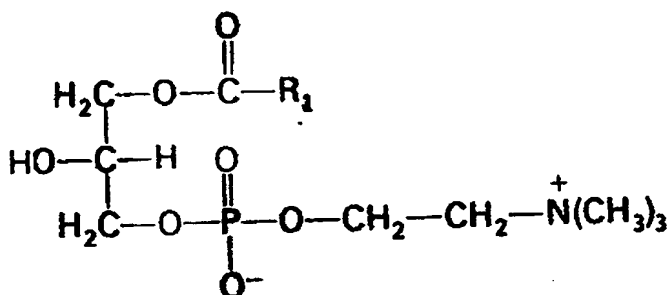
- <10> 본 발명의 목적은 선천성 면역 증강효과가 우수한 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- <11> 본 발명의 또 다른 목적은 세균성 감염질환의 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <12> 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 및 그 유도체를 포함하는 선천성 면역 증강용 조성물을 제공한다.
- <13> 또한, 본 발명에서는 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 및 그 유도체를 포함하는 세균성 감염질환의 치료용 조성물을 제공한다.
- <14> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<15> 본 발명에서 유효성분으로 사용되는 라이소포스파티딜콜린은 하기 화학식 1로 표시된다:

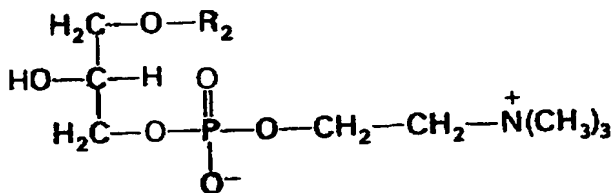
<16> 【화학식 1】



<17> 상기 식에서, R_1 은 C_{4-30} 의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C_{4-30} 의 알케닐이다. 바람직한 라이소포스파티딜콜린은 $\text{L}-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 ($\text{L}-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, Stearoyl; Lysolecithin, stearoyl); $\text{L}-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 팔미토일 ($\text{L}-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, Palmitoyl; Lysolecithin, palmitoyl); $\text{DL}-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 팔미토일 ($\text{DL}-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, Palmitoyl); 및 $\text{L}-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, 올레오일 ($\text{L}-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, Oleoyl; Lysolecithin, oleoyl)이다.

<18> 또한, 본 발명에서 유효성분은 라이소포스파티딜콜린의 유사체일 수 있고, 바람직하게는 하기 화학식 2의 라이소포스파티딜콜린의 에테르 유사체일 수 있다:

<19> 【화학식 2】



- <20> 상기 식에서 R_2 는 C_{4-30} 의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C_{4-30} 의 알케닐이다. 더 바람직하게는 $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, γ -O-알크-1-에닐 ($L-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, γ -O-Alk-1-Enyl; Lysophosphatidylcholine); $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, γ -O-알킬 ($L-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, γ -O-Alkyl; Lyso-platelet activating factor); $DL-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, γ -O-헥사데실 ($DL-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, γ -O-Hexadecyl; rac-Lyso-platelet activating factor); 및 $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린, γ -O-헥사데실 ($L-\alpha$ -Lysophosphatidylcholine, γ -O-Hexadecyl; Lyso-platelet activating factor; Lyso-PAF- C_{16})이다.
- <21> 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 상업적으로 용이하게 입수할 수 있다. 또한, 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 동물로부터 분리할 수 있고, 당업계에 잘 알려진 합성 방법으로 제조될 수도 있다.
- <22> 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 포유동물의 체내에 내재성 물질이므로 안전성은 입증된 것과 다름없다.
- <23> 본 발명에서 세균성 감염질환은 바람직하기는 복막염, 폐렴(pneumonia), 골수염(osteomyelitis), 봉소염(cellulitis), 뇌막염(meningitis) 등이 있다.
- <24> 본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 비경구 또는 경구 투여 형태로 제형화 할 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 캡셀제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예 : 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/ 또는 글리신), 활탁제(예 : 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네

습 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시 메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 압착 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

<25> 본 발명의 약제학적 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화할 수 있다.

<26> 본 발명의 조성물의 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 및 그 유사체는 인간을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.01 내지 100 mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 비경구 또는 경구적 경로를 통해 투여할 수 있다.

<27> 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<28> 실시예

<29> 실시예 1

<30> 대장균(*E. coli*)의 복강내 투여에 의한 복막염 동물모델 시험

- <31> 대장균의 복강내 투여에 의한 복막염 동물모델에서 본 발명의 조성물의 유효성분인 라이소포스파티딜콜린의 효과를 다음과 같이 조사하였다.
- <32> 14 마리의 ICR 마우스 (체중 25 내지 30 g; MJ Ltd)에, PBS(phosphate-buffered saline)에 현탁된 살아있는 대장균 (*E. coli* DH5a; ATCC) 10^8 개를 복강내 (intraperitoneal) 주사한 후, 7 마리씩 2개의 군 (실험군 및 대조군)으로 나누어, 실험군 ICR 마우스들에는 대장균의 복강내 주사 2 및 14시간 후에 각각 1 회씩 지방산이 없는 1% BSA(bovine serum albumin) 용액에 녹인 $L-\alpha$ -라이소포스파티딜콜린 스테아로일 (Sigma)을 각각 10mg/kg의 양으로 피하주사로 투여하였고, 대조군의 ICR 마우스들에는 라이소포스파티딜콜린 대신 동량의 지방산이 없는 1% BSA 용액을 동일한 방식으로 투여하였다.
- <33> 대장균의 복강내 주사 24시간 후에 각 군의 ICR 마우스들의 생존율과 복강내 대장균 수를 측정 (마우스 복막의 멸균 생리식염수 세척액을 Hank's Balanced 염 용액(HBSS)으로 1/100으로 희석하여, Trypticase Soy 아가(BD BBL 사, USA)상에서 배양하여 콜로니 형성 단위(Colony Forming Unit(CFU))를 센다)하여, 그 평균값을 도 1a 및 도 1b에 나타내었다.
- <34> 도 1a 및 도 1b에 도시된 바와 같이, 라이소포스파티딜콜린이 투여된 실험군의 마우스들은 복막염에 기인한 사망률이 유의하게 억제되었고 ($P < 0.05$), 또한 복강내 대장균 수도 감소되었다 ($P < 0.01$).

<35> 실시예 2

<36> 맹장 결찰 및 천공 (Cecal Ligation and Puncture; CLP) 동물모델 시험

<37> 맹장 결찰 및 천공(CLP)를 이용하여 마우스에 복막염(peritonitis)을 유발하였다.

<38> 14 마리의 ICR 마우스 (체중 25 ~ 30 g; MJ Ltd.)를 펜토바비탈로 마취시킨 후, 복부 오른쪽 부위를 1cm 길이로 절개하고 맹장을 노출시킨 다음, 회맹부 관 (ileocecal valve) 아래 부위를 결찰한 후 맹장에 21 게이지 바늘로 4개의 구멍을 내고, 복부를 다시 봉합하여 복막염을 유발하였다. 봉합한 지 2 및 14 시간 후에 각각 1회씩, 7 마리의 ICR 마우스에게는 지방산이 없는 1% BSA 용액에 녹인 L- α -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 (Sigma)을 10mg/kg의 양으로 피하주사로 투여하고 (실험군), 7 마리의 ICR 마우스에게는 등량의 지방산이 없는 1% BSA 용액을 동일한 방식으로 투여하였다 (대조군).

<39> CLP 수술 24시간 후에 각 군의 ICR 마우스의 복강내 대장균 수를 측정 (실시에 1과 같은 방식으로)하여, 그 결과를 도 2에 도시하였다.

<40> 도 2에서 알 수 있듯이, 라이소포스파티딜콜린이 투여된 실험군의 마우스들은 복강내 세균수가 현저하게 감소됨을 확인할 수 있다 ($P < 0.01$).

<41> 실시예 3

<42> 항균 작용에 대한 시험

<43> LB 배지에 L- α -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일 (Sigma)을 12, 60, 300 mM 농도로 첨가하여 60mm 페트리디쉬 (각 그룹 당 4개씩) 상에 부어서 굳히고 (실험군), 대조군으로 4개의 60mm 페트리디쉬에 LB 배지만을 부어서 굳힌후, 각군의 페트리디쉬의 굳은

배지 위에, 실시예 2에 따른 CLP 24시간 후 대장균 마우스들의 복막을 멸균 생리식염수로 세척한 세척액을 HBSS로 1/100 희석하여 10 μ l씩 뿌린다. 그리고 나서, 37℃ 세균 배양기에 12시간동안 배양한 후, 콜로니(colony) 수를 육안으로 측정하여 그 결과를 표 1에 기재하였다.

<44> 표 1

<45> 콜로니 수

<46> 대 장 균	실 험 군		
	LPC(12 μ M)	LPC(60 μ M)	LPC(300 μ M)
498 \pm 89	661 \pm 85	639 \pm 04	611 \pm 81

<47> 상기 표 1에서 알 수 있듯이, 라이소포스파티딜콜린은 대장균에 대해 직접적인 항균작용은 보이지 않았다.

<48> 따라서 도 1a, 도 1b 및 도 2에서의 라이소포스파티딜콜린의 생체내 투여로 인한 복막염 치료효과는 라이소포스파티딜콜린의 세균에 대한 직접적인 항균작용이 아니라, 간접적으로 마우스의 선천성 면역을 증강시킴에 의한 것이라는 결론을 내릴 수가 있게 되었다.

【발명의 효과】

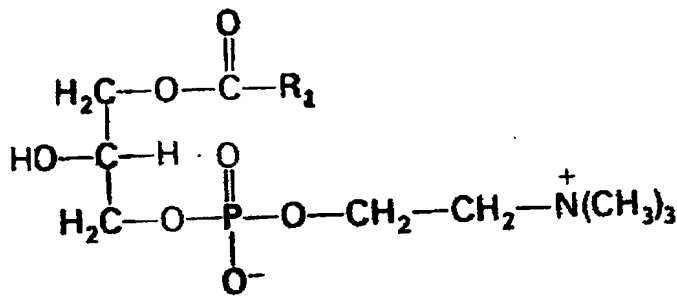
<49> 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 및 그 유도체를 함유하는 본 발명의 조성물은 복막염, 폐렴, 골수염, 봉소염, 골수염 등의 비롯한 다양한 세균성 감염질환 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

<50> 또한, 유효성분으로서 라이소포스파티딜콜린 및 그 유도체를 함유하는 본 발명의 조성물은 감염성 질환에 치료제와 함께 투여하면 선천성 면역증강 작용에 의해 감염성 질환치료를 증진시킬 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

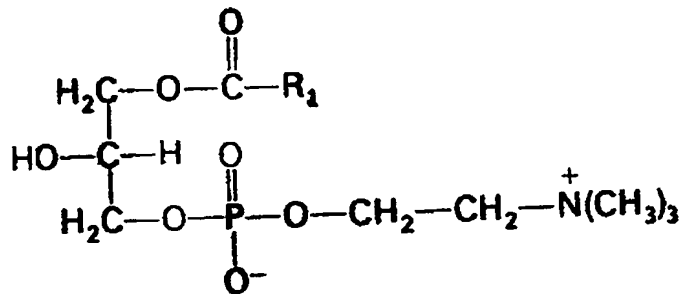
유효성분으로서 하기 화학식 1로 표시되는 라이소포스파티딜콜린 및 그것의 유사체를 포함하는 선천성 면역 증강용 조성물:

화학식 1

상기 식에서, R₁은 C₄-30의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C₄-30의 알케닐이다.

【청구항 2】

유효성분으로서 하기 화학식 1로 표시되는 라이소포스파티딜콜린 및 그것의 유사체를 포함하는 세균성 감염질환 치료용 약제학적 조성물:

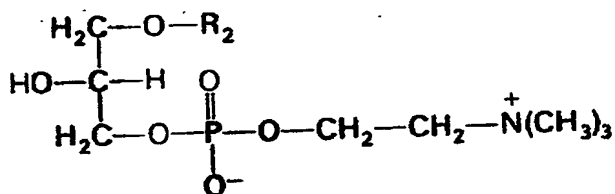
화학식 1

상기 식에서, R_1 은 C_{4-30} 의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C_{4-30} 의 알케닐이다.

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 유사체는 하기 화학식 2로 표시되는 라이소포스파티딜콜린의 에테르 유사체인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 2



상기 식에서, R_2 는 C_{4-30} 의 알킬이거나 하나 또는 그 이상의 이중결합을 지닌 C_{4-30} 의 알케닐이다.

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 상기 라이소포스파티딜콜린의 에테르 유사체는 L - α -라이소포스파티딜콜린, γ -O-알크-1-에닐; L - α -라이소포스파티딜콜린, γ -O-알킬; DL - α -라이소포스파티딜콜린, γ -O-헥사데실; 및 L - α -라이소포스파티딜콜린, γ -O-헥사데실으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 라이소포스파티딜콜린은 L - α -라이소포스파티딜콜린, 스테아로일; L - α -라이소포스파티딜콜린, 팔미토일;

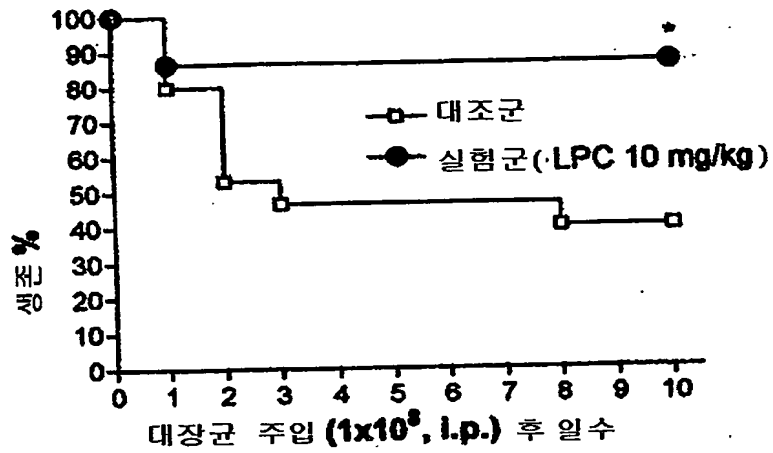
DL- α -라이소포스파티딜콜린, 팔미토일; 및 L- α -라이소포스파티딜콜린, 올레오일로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

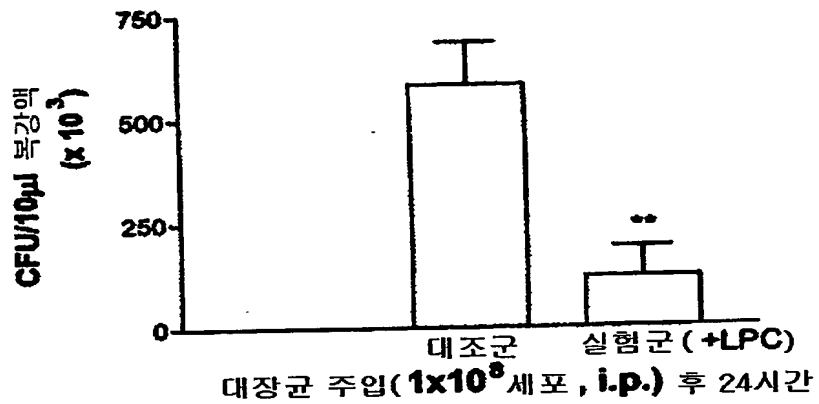
제 2항에 있어서, 상기 세균성 감염질환은 복막염, 폐렴, 골수염, 봉소염 및 뇌막염으로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【도면】

【도 1a】



【도 1b】



【도 2】

